

CELL-ADHESIVE SUBSTRATE

Publication number: JP2002253204

Publication date: 2002-09-10

Inventor: TAGUCHI TAKAHISA; KUDO TAKU; KAWASAKI
TAKASHI

Applicant: NAT INST OF ADV IND & TECHNOL

Classification:

- international: **C12M3/00; C12M1/40; C12M3/00; C12M1/40;** (IPC1-7):
C12M3/00; C12M1/40

- European:

Application number: JP20010053264 20010228

Priority number(s): JP20010053264 20010228

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2002253204

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a substrate excellent in cell adhesiveness. **SOLUTION:** This cell-adhesive substrate is one having a titanium oxide coat. The cell-adhesive substrate has the following merits; (1) having high endurance and forming an adhesive layer stable for a long term, (2) capable of reuse, (3) having very low cytotoxicity, (4) relatively easily formable for the coat, (5) enabling UV sterilization or autoclave sterilization, (6) capable of controlling visible-light transmissivity of the coat by adjusting the baking conditions and so directly observing cultured cell or the like with a microscope or the like by, as the substrate, using a material having a high light-transmissivity (especially a glass) and (7) capable of pattern-forming of the coat.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-253204

(P2002-253204A)

(43) 公開日 平成14年9月10日 (2002.9.10)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | データベース* (参考) |
|---------------------------|------|--------------|--------------|
| C 1 2 M 3/00 | | C 1 2 M 3/00 | A 4 B 0 2 9 |
| 1/40 | | 1/40 | B |

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願2001-53264(P2001-53264)

(22) 出願日 平成13年2月28日 (2001.2.28)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(72) 発明者 田口 隆久

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 経済産業省産業技術総合研究所大阪工業技術研究所内

(72) 発明者 工藤 卓

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 経済産業省産業技術総合研究所大阪工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞接着性基材

(57) 【要約】

【課題】細胞接着性に優れた基材の提供

【解決手段】酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材。

本発明の細胞接着性基材は、以下の長所を有している。

(1) 耐久性が高く、長期間にわたり安定した接着層を形成する。(2) 再利用が可能である。(3) 細胞毒性がきわめて少ない。(4) 成膜が比較的容易にできる。(5) UV滅菌、オートクレーブ滅菌が可能である。(6) 焼成条件を調節することによって被膜の可視光透過性を調整することができ、基材に光透過性の高い材料（特にガラス）を用いることによって培養した細胞等をそのまま顕微鏡等で観察することが可能である。(7) 被膜をパターン形成することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材。

【請求項2】チタン被膜を基材にコーティングし焼成することにより得られる請求項1に記載の細胞接着性基材。

【請求項3】コーティング方法がスパッタリングであることを特徴とする請求項2に記載の細胞接着性基材。

【請求項4】基材がカバーガラスであることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の細胞接着性基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、細胞培養基質の表面処理によって細胞の接着を制御する技術としては、細胞培養基質のガラス表面をポリリシンやポリオルニチン等のアミノ酸やポリエチレンイミンなどでコートする方法が多く使用されている。しかし、これらのコート膜は比較的耐久性が低く、特に、長期間神経細胞を生存させる場合には必ずしも有効ではない。また、コートされた細胞質基質を一度細胞培養に使用した後は、コート膜がガラス表面から容易にはがれてしまい、再利用することができない。さらに、培養液中に遊離した分子には細胞毒性があり、コートの時間、洗浄方法等によってこれら分子の遊離状況が変化するため、安定したコート膜を形成しにくいという欠点がある。

【0003】また、従来のポリリシン、ポリオルニチン、ポリエチレンイミンなどによる細胞接着被膜は、UV滅菌やオートクレーブ滅菌ができないという欠点もあった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材の提供を目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材が細胞接着性に優れることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】すなわち、本発明は、以下の細胞接着性基材を提供するものである。

項1．酸化チタン被膜を有する細胞接着性基材。

項2．チタン被膜を基材にコーティングし焼成することにより得られる項1に記載の細胞接着性基材。

項3．コーティング方法がスパッタリングであることを特徴とする項2に記載の細胞接着性基材。

項4．基材がカバーガラスであることを特徴とする項1～3のいずれかに記載の細胞接着性基材。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明において 基材は チタン

によるコーティングが可能であり、焼成によって不必要な変形等を生ずることがないものであれば特に制限されず、用途に応じて適宜選択される。例えば、ガラス、金属などが基材として使用可能である。細胞培養用カバーガラスを作成する場合、好ましい基材はガラスであり、さらに好ましくは顕微鏡用カバーガラスである。細胞外電位記録電極基板又は生体埋込型神経電極基板又は神経再接続材料を作成する場合、好ましい基材は、それぞれガラス、又はガラス、樹脂もしくは金属、又はガラス、樹脂もしくは金属である。基材の形状は用途に応じて適宜選択される。

【0008】チタン被膜を基材にコーティングする方法としては、めっき、無電解めっき、アノード酸化、ゾル-ゲル法などの液相コーティング、CVD、PVDなどの気相コーティング等が使用でき、好ましくはPVDである。PVDとしては、例えば真空蒸着、イオンプレーティング、スパッタリング、分子線エピタキシー法等が使用でき、好ましくはスパッタリングである。

【0009】上記のようなコーティング法により形成された被膜の膜厚は特に制限されないが、好ましくは10～1000Å、さらに好ましくは50～500Å、より一層好ましくは100～300Åである。

【0010】チタン被膜がコーティングされた基材を焼成する方法としては、クリーンオープン、電気炉中で加熱する方法が採用される。加熱温度は基材、膜厚等に応じて適宜選択されるが、好ましくは200～800℃、さらに好ましくは250～500℃、より一層好ましくは300～400℃である。加熱時間は、加熱温度、膜厚等に応じて適宜選択されるが、好ましくは10～100分、さらに好ましくは20～60分、より一層好ましくは25～40分である。

【0011】本発明の細胞接着性基材は、細胞培養用カバーガラス、細胞外電位記録電極基板、生体埋込型神経電極基板、神経再接続材料として有用であり、接着性に劣る神経細胞の接着性においても優れたものである。

【0012】

【発明の効果】本発明の細胞接着性基材は、以下の長所を有している。(1)耐久性が高く、長期間にわたり安定した接着層を形成する。(2)再利用が可能である。(3)細胞毒性がきわめて少ない。(4)成膜が比較的容易にできる。(5)UV滅菌、オートクレーブ滅菌が可能である。(6)焼成条件を調節することによって被膜の可視光透過性を調整することができ、基材に光透過性の高い材料（特にガラス）を用いることによって培養した細胞等をそのまま顕微鏡等で観察することが可能である。(7)被膜をパターン形成することが可能である。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0014】実施例1

細胞接着性カバーガラスの作成

通常使用されている培養用カバーガラス（直径22mm、厚さ0.17mm、Matsunami製）に、以下の条件で、焼成方法のことなる3種類のチタン被膜を真空成膜する（図1）。

【0015】成膜方法：スパッタリング

焼 成：300℃で30分（クリーンオープン中）、又は350℃で30分（電気炉—大気雰囲気中）

水 洗：純粋シャワー洗浄（20秒）の後クリーンエアブロー

滅菌処理：90%エタノール処理（15分）後、滅菌miriQ水で3回洗浄し、UV滅菌（30分）

得られた被膜は膜厚が158～260Åで、酸化処理（焼成）により、被膜の顕微鏡観察が可能な程度に可視光透過性が増し、導通もかなり減少していた。

【0016】実施例2

細胞接着性カバーガラスの評価

実施例1で作成した各カバーガラスの細胞接着性評価を、胚齢18日齢のラット海馬解離培養系を用いて行った。

【0017】D-MEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）とF12（Ham's Medium F12）とを1：1の比率で含有する混合培養液に、インシュリン、ペニシリン—ストレプトマイシン混合液（100unit—100μg/ml）、牛胎児血清及び馬血清を、混合培地に対して、インシュリンが5μg/ml、ペニシリンが100unit/ml、ストレプトマイシンが100μg/ml、牛胎児血清が5%（v/v）、馬血清が5%（v/v）の濃度になるように添加した。この培養液に、ラット海馬から解離した神経細胞を、細胞密度が15万個/mlとなるよう加えた。

【0018】実施例1で作成したカバーガラスをUV滅菌及びオートクレーブ滅菌した後、培養皿に置き、ラット海馬解離神経細胞を含有する2mlの培養液を加え、細胞を培養した。培養後、10日目にカバーガラスの細胞接着の状態を顕微鏡で観察した（図2、図3）。

【0019】比較例1

培養皿に培養用カバーガラスを置き、1mlのポリ—リシン水溶液（25μg/ml）を加えて、2時間30分静置した後、ポリ—リシン水溶液を棄てた。ポリ—リシンコートされたカバーガラスを滅菌水にて4回洗浄し、よく乾燥させて、ポリ—リシン成膜カバーガラスを得た。次に、細胞接着性カバーガラスとしてここで得られたポリ—リシン成膜カバーガラスを用い、UV滅菌及びオートクレーブ滅菌を行わないこと以外は実施例2と同様にして、細胞接着の状態を観察した（図4）。図2及び3と図4とを比較して明らかなように、本発明のカバーガラスで培養した神経細胞（図2及び3）は従来のカバーガラスで培養した神経細胞（図4）

より、神経細胞突起の伸長及びグリア細胞の増殖に優れている。

【0020】実施例3

・ニワトリ胚終脳解離培養系による評価

ラット海馬から解離した神経細胞を、ニワトリ胚終脳から解離した神経細胞に代え、血清として牛胎児血清のみを10%（V/V）使用した以外は実施例2と同様にして、細胞接着の状態を観察した。顕微鏡観察の結果、比較例1の細胞接着の状態より細胞接着性は良好であった。

【0021】・細胞接着性（Mg²⁺-free記録外液存在下）

Mg²⁺-free記録外液（130mMのNaCl、3mMのKCl、2mMのCaCl₂、10mMのグルコース、10mMのNa-Hepes（pH7.3））はCa²⁺濃度が低くMg²⁺を含まないため、細胞と皮膜の接着性を劣化させる作用がある。実施例1で得られた細胞接着性カバーガラスおよび比較例で得られたポリ—リシンコートカバーガラスの各10枚をMg²⁺-free記録外液に室温で30時間浸漬し、細胞の接着性を観察した。その結果、ポリ—リシンコートカバーガラスでは40%のカバーガラスに細胞の剥離が観察されたが、実施例1で得られたカバーガラスでは細胞の剥離が観察されたのは10%であった。

【0022】・神経細胞の電気的活動

ホールセル記録法

実施例1で得られた細胞接着性カバーガラスおよび比較例で得られたポリリシンコートカバーガラスで12日間培養されたラット（胚齢18日齢）神経細胞の電気的活動を電位固定法又は電流固定法によりホールセル記録法で測定した。測定条件は以下の通りである。

ガラス電極：内径約1μm

電極内液：130mMのグルコン酸カリウム、10mMのKCl、0.2mMのCaCl₂、2mMのMgCl₂、1mMのEGTA、2mMのMg-ATP、10mMのK-Hepes（pH7.3）

記録外液：130mMのNaCl、3mMのKCl、2mMのCaCl₂、10mMのグルコース、1mMのMgCl₂、10mMのNa-Hepes（pH7.2）

その結果、神経細胞の電気的活動である興奮性シナプス後電流及び活動電位を確認することができた。

【図面の簡単な説明】

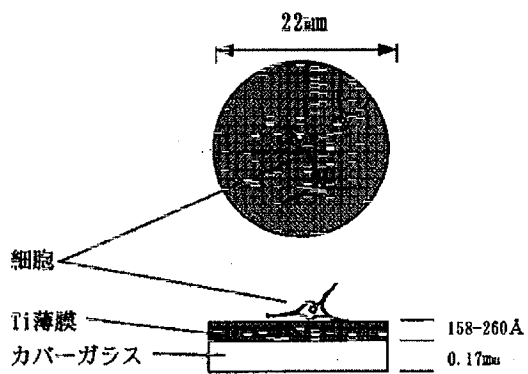
【図1】本発明の細胞接着性カバーガラスを上から見た模式図及び横から見た模式図である。

【図2】チタン皮膜を300℃で焼成した本発明カバーガラスにて培養した神経細胞を撮影した顕微鏡写真である。

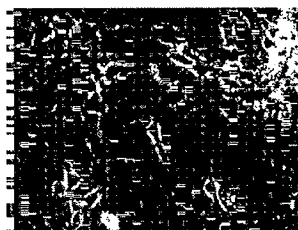
【図3】チタン皮膜を350℃で焼成した本発明カバーガラスにて培養した神経細胞を撮影した顕微鏡写真である。

【図4】従来のポリ—リシン皮膜カバーガラスにて培養した神経細胞を撮影した顕微鏡写真である。

【図1】



【図2】



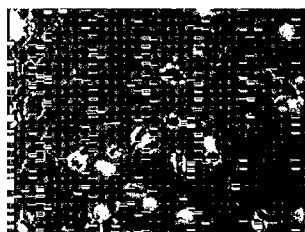
胚齢18日培養10日目

【図3】



胚齢18日培養10日目

【図4】



胚齢18日培養10日目

フロントページの続き

(72)発明者 川▲崎▼ 隆史

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 経済産業省産業技術総合研究所大阪工業技術研究所内

Fターム(参考) 4B029 AA21 BB01 CC03 CC08